

DERWENT- 1981-11846D

ACC-NO:

DERWENT- 198108

WEEK:

COPYRIGHT 1999 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Preparation of cells on microscope slides - by filtering from body fluids with a plastic membrane filter, fixing, rendering the membrane filter transparent, and staining

INVENTOR: AEIKENS, B; BEER, H ; NUSSBAUMER, D ; PERL, H ; PRADEL, G

PATENT-ASSIGNEE: SARTORIUS GMBH[SARS]

PRIORITY-DATA: 1979DE-2928790 (July 17, 1979) , 1980DE-3023849 (June 25, 1980)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES	MAIN-IPC
DE 2928790 A	February 12, 1981	N/A	000	N/A
DE 2928790 C	December 3, 1987	N/A	000	N/A

APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DESCRIPTOR	APPL-NO	APPL-DATE
DE 2928790A	N/A	1979DE-2928790	July 17, 1979

INT-CL (IPC): G01N001/28, G01N033/48 , G02B021/34

ABSTRACTED-PUB-NO: DE 2928790A

BASIC-ABSTRACT:

New process is claimed for obtaining and evaluating cell prepn.s. from liq. media (esp. urine and body fluids) for test or indications of tumours, in which the cells are applied to a transparent microscope slide, fixed, stained, and examined and evaluated. The liq. medium is filtered by means of a plastic porous membrane filter having a pore size such as to retain the cells under investigation. The cells are simultaneously or subsequently fixed on the membrane filter, and the membrane filter is converted into a transparent state before or after it is placed on the microscope slide. The cells are stained using one or more dye baths after the membrane filter has been converted into the transparent state.

New appts. for carrying out the above process is a prepn. set comprising (a) a disposable syringe with an attachable filter with a porous plastic membrane filter; (b) a fixing agent for preserving organic cells; (c) a chemical liq. to convert the membrane filter into transparent state; (d) a chemical dye bath for staining the organic cells; and (e) a transparent slide to take the membrane filter.

ABSTRACTED-PUB-NO: DE 2928790C

EQUIVALENT-ABSTRACTS:

New process is claimed for obtaining and evaluating cell prepn.s. from liq. media (esp. urine and body fluids) for test or indications of tumours, in which the cells are applied to a transparent microscope slide, fixed, stained, and examined and evaluated. The liq. medium is filtered by means of a plastic porous membrane filter having a pore size such as to

retain the cells under investigation. The cells are simultaneously or subsequently fixed on the membrane filter, and the membrane filter is converted into a transparent state before or after it is placed on the microscope slide. The cells are stained using one or more dye baths after the membrane filter has been converted into the transparent state.

New appts. for carrying out the above process is a prepn. set comprising (a) a disposable syringe with an attachable filter unit with a porous plastic membrane filter; (b) a fixing agent for preserving organic cells; (c) a chemical liq. to convert the membrane filter into transparent state; (d) a chemical dye bath for staining the organic cells; and (e) a transparent slide to take the membrane filter.

DERWENT-CLASS: A89 B04 J04 P81 S03

CPI-CODES: A03-A01; A12-H04; A12-V03C; B04-B04A; B04-B04B; B04-C02; B12-K04; J04-B01;

EPI-CODES: S03-E13D; S03-E14H;

51

Int. Cl. 3:

G 01 N 33/48

19 BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

G 01 N 1/28

G 02 B 21/34

DEUTSCHES



PATENTAMT

29 28 790 A 1

DE 29 28 790 A 1

11

Offenlegungsschrift 29 28 790

21

Aktenzeichen:

P 29 28 790.9

22

Anmeldetag:

17. 7. 79

43

Offenlegungstag:

12. 2. 81

31

Unionspriorität:

22 23 31

52

Bezeichnung:

Verfahren und Vorrichtung zur Gewinnung und Auswertung von Zellpräparaten aus flüssigen Medien, insbesondere aus Urin u.a. Körperflüssigkeiten für die Prüfung auf Tumorerkrankungen

71

Anmelder:

Sartorius GmbH, 3400 Göttingen

72

Erfinder:

Aelkens, Bernhard, Dr.med., 3004 Isernhagen;
Beer, Hans, Dipl.-Chem. Dr., 3401 Nikolausberg;
Nußbaumer, Dieter, Dipl.-Chem. Dr.; Perl, Horst, Dipl.-Chem. Dr.;
Pradel, Günter; 3400 Göttingen

17.07.79

2928790

Sartorius GmbH

Akte SM 7904

Weender Landstraße 94-108

K8/k1

3400 Göttingen

Verfahren und Vorrichtung zur Gewinnung und Auswertung von Zellpräparaten aus flüssigen Medien, insbesondere aus Urin und anderen Körperflüssigkeiten für die Prüfung auf Tumorverdacht

5

Patentansprüche

1. Verfahren zur Gewinnung und Auswertung von Zellpräparaten aus flüssigen Medien, insbesondere aus Urin und anderen Körperflüssigkeiten für die Prüfung auf Tumorerdacht, bei dem die Zellen auf einen mikroskoptechnisch transparenten Objektträger aufgetragen, fixiert, zur Sichtbarmachung angefärbt, labormäßig untersucht und ausgewertet werden, dadurch gekennzeichnet, daß das flüssige Medium mit Hilfe eines porösen Membranfilters aus Kunststoff filtrierte wird, wobei das Membranfilter eine die zu präparierenden Zellen zurückhaltende Porengröße aufweist,

15

030067/0109

2928790

- gleichzeitig bzw. anschließend die Fixierung der Zellen auf dem Membranfilter erfolgt und das Membranfilter vor oder nach dessen Festlegung auf dem Objektträger chemisch in einen transparenten Zustand überführt wird und die Zellen vor oder nach dem Festlegen des Membranfilters, jedoch nach dessen Überführung in den transparenten Zustand, auf dem Objektträger in einem Färbebad bzw. mehreren Färbebädern optisch sichtbar angefärbt werden.
- 5
- 0 2. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch ein Präparationsset umfassend
- eine Einwegspritze (1) mit aufsteckbarem Filtervorsatz (3), dessen Membranfilter (4) aus porösem Kunststoff gebildet ist,
 - ein Fixierungsmittel (9) zur Haltbarkeitmachung organischer Zellen (5),
 - 5 - eine chemische Flüssigkeit (10) zum Überführen des Membranfilters (4) in einen transparenten Zustand,
 - ein chemisches Färbebad (11) zum Anfärben der organischen Zellen (5) und
 - 1 - einen transparenten Objektträger (8) zur Aufnahme des Membranfilters (4).

2928790

3. Vorrichtung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Membranfilter (4) eine Porengröße aufweist, die gleich oder kleiner als 8 μ m ist.
4. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Membranfilter (4) aus Zello-loseacetat, Zellulosenitrat oder Zellulosehydrat be-
steht.
5. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 2 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das chemische Mittel (10) zur Über-
führung des Membranfilters (4) in den transparenten Zu-
stand auf der Basis von Polypropionat / n-Hexan bzw.
Isoamylacetat / n-Hexan gebildet ist.

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von Zellpräparaten aus flüssigen Medien, insbesondere aus Urin und anderen Körperflüssigkeiten für die Prüfung auf Tumorerkrankung, bei dem die Zellen auf einen mikroskoptechnisch transparenten Objektträger aufgetragen, fixiert, zur Sichtbarmachung angefärbt, labormäßig untersucht und ausgewertet werden. Die Erfindung betrifft gleichzeitig eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens.

Die bisher bekannten Methoden zur Früherkennung z.B. von Blasenkrebs sind umständlich, aufwendig und damit sehr teuer, so daß die Vorsorge in der Regel nicht durchgeführt wird. Nachteilig bei den bekannten Methoden ist auch, daß die zu untersuchenden Zellen nicht einwandfrei aus den Körperflüssigkeiten abgeändert werden können. So ist es z.B. bereits bekannt, die Urinprobe zu zentrifugieren. Dabei gelangen jedoch neben den eigentlichen zu untersuchenden Zellen auch eine Vielzahl von anderen im Urin enthaltenen Substanzen, wie Kristalle, in die Probe, die in einem kleinen Probefläschchen durch chemische Mittel fixiert und damit haltbar gemacht werden.

Die mikroskopische Untersuchung derartiger Urinproben erfolgt nach den üblichen Labormethoden. Nachteilig ist auch, daß sich derartige Proben schlecht handhaben lassen, nicht

17.07.79

2928790

et. andere gut zum Versand geeignet sind und die Zellen der Fäulnis unterliegen, so daß eine optimale mikroskopische Auswertung nicht möglich ist.

5 Weiterhin ist bekannt, zur Zellgewinnung sog. Cytozentrifugen zu verwenden, mit denen die flüssige Probe durch Zentrifugalkraft auf einen Objektträger aufgetragen wird. Hierbei erfolgt die Verteilung der zu untersuchenden Zellen ungleichmäßig und mit den Zellen auch andere in der zu untersuchenden Probe enthaltenen Stoffe, so daß keine einwandfreie Separierung der zu untersuchenden Zellen möglich ist. Derartige Cyto-

10 zentrifugen sind für kleinere Labors zu teuer und aufwendig. Für die Herstellung solcher Präparate durch den Patienten selbst, ist diese Methode erst recht ungeeignet.

15 Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, mit einfachen Mitteln ein Verfahren und eine Vorrichtung zu schaffen, mit dem insbesondere das Vorhandensein von Tumorzellen geprüft werden kann und bei dem die Zellen aus flüssigen Medien, wie

20 Urin oder andere Körperflüssigkeiten, gewonnen werden können, und zwar so, daß die Zellgewinnung sowohl labormäßig mit den üblichen Labormethoden als auch durch die Patienten selbst erfolgen kann, und daß neben einer vereinfachten Handhabung, einen einfachen Versand, auch das Verfahren wirtschaftlich tragbar ist.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß das flüssige Medium mit Hilfe eines porösen Membranfilters aus Kunststoff filtriert wird, wobei das Membranfilter eine die zu präparierenden Zellen zurückhaltende Porengröße aufweist, anschließend die Fixierung der Zellen auf dem Membranfilter erfolgt und das Membranfilter vor oder nach dessen Festlegung auf dem Objektträger chemisch in einen transparenten Zustand überführt wird und die Zellen vor oder nach dem Festlegen des Membranfilters - jedoch nach dessen Überführung in den transparenten Zustand - auf dem Objektträger in einem Färbebad optisch sichtbar angefärbt und labormäßig weiterbehandelt und ausgewertet werden.

Als Membranfilter finden z.B. solche auf der Basis von Zelluloseacetat, Zellulosenitrat oder Zellulosehydrat Verwendung. Derartige Membranfilter haben eine schwammartige Struktur und sind aufgrund der vielen Poren und Lufteinschlüsse opak. Es hat sich gezeigt, daß die Verankerung der Zellen auf der Filteroberfläche wegen der offenporigen Struktur besonders gut ist, so daß die Zellen auch während des Eintauchens des Filters in das Transparenzbad auf der Oberfläche haften bleiben und in dieser teilweise verankert werden, wenn die schwammartige Struktur des Filters zusammenbricht und in eine folienförmige transparente Struktur überführt wird.

Unter Weiterbehandlung des Präparates ist zu verstehen, daß die Zellen ein Einbettungsmittel erhalten und das Präparat mittels eines Deckglases eingedeckt wird, und zwar ist sowohl die Eindeckung in wasserhaltigen als auch in wasserfreien Medien möglich. Die Einfärbung kann dabei mit Hilfe der in der Labortechnik üblichen Färbeautomaten erfolgen, wobei die Einfärbung z.B. nach der Methode Papanicolaou erfolgen kann, die sich insbesondere für die Sichtbarmachung von Tumorzellen besonders bewährt hat. Das erfindungsgemäße Verfahren zur Gewinnung von Zellpräparaten eignet sich wegen seiner Lagerfähigkeit besonders gut zur Archivierung und Dokumentation und zur optimalen Auswertung. Die Auswertung kann dabei in der üblichen Weise visuell mit Hilfe von Mikroskopen als Einzelauswertung aber auch in Form einer automatischen zytologischen Auswertung geschehen, und zwar sowohl mit Hilfe von TV-Geräten als auch mit Hilfe der Zytophotometrie automatisch. Diese Untersuchungen können im sichtbaren Wellenbereich, im UV-Wellenbereich sowie mit Hilfe fluorometrischer Messungen erfolgen.

20

Um die Handhabung für die Erstellung des Präparates so einfach wie möglich zu gestalten, wird mit Hilfe einer Einwegspritze ~~die Urinprobe in die Spritze gezogen, ein Einwegfiltervorsatz~~ auf die Spritze gesteckt und die Urinprobe filtriert.

Anschließend erfolgt die Entnahme des Membranfilters aus Kunststoff aus dem Filtervorsatz und dessen Befestigung auf einem transparenten Objektträger aus Glas oder Kunststoff und die Fixierung der Zellen auf dem Filter.

5

Diese Verfahrensschritte sind so einfach, daß sie nicht nur von jedem Laborgehilfen, sondern auch von Patienten selbst durchgeführt werden können. Nach Abschluß dieser Verfahrensschritte kann das Präparat in der beschriebenen Weise weiterbehandelt bzw. zur Weiterbehandlung an Dienstleistungslabors verschickt werden. Das erfindungsgemäße Verfahren ist im Vergleich zu den eingangs beschriebenen Untersuchungsmethoden und Präparationsverfahren relativ einfach und billig.

10

15

Der Erfindungsgedanke ist in einem Ausführungsbeispiel anhand der beiliegenden Zeichnung näher erläutert. Dabei zeigen Fig. 1 bis 6 in chematischer Darstellung die einzelnen Verfahrensschritte.

20

Gemäß Fig. 1 wird die Urinprobe 2 mit einer Einwegspritze 1 aufgenommen und gemäß Fig. 2 mit einem Spritzenvorsatz 3 versehen, welcher in seinem Inneren ein Membranfilter 4 aus Kunststoff hat, dessen Porengröße so bemessen ist, daß die in der Urinprobe 2 enthaltenen Zellen 5 auf dem Membranfilter 4 zurück-

gefiltert werden und das gesamte Filtrat 7 separiert wird.

Das Membranfilter hat z.B. eine Porengröße von 8 µm.

Gemäß Fig. 3 wird das aus dem Spritzenvorsatz 3 entnommene
5 Membranfilter 4 auf einen transparenten Objektträger 8 aus
Glas oder Kunststoff aufgebracht und festgelegt. Die auf der
Oberfläche des Membranfilters 4 befindlichen Zellen 5 wer-
den mit Hilfe eines Fixierungsmittels 9 z.B. Aceton/Alkohol
in Sprayform oder flüssiger Form haltbar gemacht. Eine geringe
10 Menge Fixierungsmittel kann auch in flüssiger Form dem Spritzen-
satz beigelegt sein, so daß das Fixierungsmittel auch mit Hilfe
der Einwegspritze 1 auf das Filter 4 aufgetragen werden kann
bzw. kann in fester Form auf dem Filter aufgetragen sein.
Die Präparierung kann bis zu diesem Schritt auch vom Patienten
15 selbst erfolgen.

In dieser Präparierungsphase ist es möglich, das Präparat nach
Kennzeichnung und Anbringen eines Identifizierungscodes auf
dem Postweg oder sonstwie an Untersuchungslabors zu verschicken.
20 Wird dieser Weg nicht gewählt, so erfolgt gemäß Fig. 4 un-
mittelbar die labormäßige Weiterbehandlung des Präparates, die
darin besteht, daß in einem chemischen Bad 10 das Membranfil-
ter 4 aus Kunststoff in einen transparenten Zustand überführt
wird, der dem des transparenten Objektträgers 8 angeglichen ist.
25 Die schwammartige Filterstruktur wird dabei von dem chemischen
Transparenzbad 10 angelöst, wobei die gesamte Filterstruktur
in einen folienförmigen, transparenten Zustand übergeht.

Als Mittel zur Überführung des Membranfilters in den transparenten Zustand eignen sich Lösungen auf der Basis von Propylpropionat / n - Hexan bzw. Isoamylacetat / n - Hexan.

5 In einem anschließenden Färbebad 11 werden die auf dem Membranfilter 4 befindlichen Zellen 5 in herkömmlicher Weise so angefärbt, daß sie auf dem transparenten Membranfilter 4 sichtbar werden. Anschließend erfolgt ebenfalls in herkömmlicher Weise die Eindeckung des Präparates mit Hilfe wasserhaltiger
10 oder auch wasserfreien Einbettungsmittel und Abdeckung durch ein Deckglas 13.

Das transparente Membranfilter 4 liegt planparallel auf dem Objektträger 8 auf und durch die Eindeckung und das Deckglas 13,
15 (auch aus Kunststoff), wird eine planparallele, definierte optische Ebene geschaffen, damit auch im automatischen Einsatz zur Auswertung des Mikroskop 12 eine gleichbleibende Einstellung beibehalten kann. Das Mikroskop 12 kann zur elektronischen Auswertung mit einem Scanningtisch verbunden sein und es können
20 andere Peripheriegeräte angeschlossen werden.

Abweichend von der Fixierungsmethode gemäß Fig. 3 ist es auch möglich, die Zellen 5 des Membranfilters 4 vor Aufbringen auf den Objektträger 8 zu fixieren und die Zellen 5 zwischen der

Filterrückseite und dem Objektträger einzuschließen. Aufgrund der guten Planparallelität des transparenten Filters wird auch in diesem Fall eine einwandfreie planparallele optische Bezugsebene geschaffen.

5

Als Membranfilter finden vorzugsweise Filter aus Zelluloseacetat, Zellulosenitrat, Zellulosehydrat Verwendung, welche einerseits mit den Chemikalien des Färbebadcs verträglich sind und sich andererseits in eine transparente Form im Transparenzbad 10 überführen lassen.

10

Das beschriebene Verfahren zur Gewinnung von Zellpräparaten läßt sich auch auf die Fälle anwenden, in denen nicht von vornherein die zu untersuchenden Zellen in einem flüssigen Medium enthalten sind. Zum Beispiel können Abstriche (Gynäkologie) in einer wässrigen Lösung soweit verflüssigt werden, daß sie sich filtrieren lassen und die Zellen allein oder zumindest mit nur geringen Verunreinigungen auf dem Filter zurückbleiben.

15

20 Die Membranfilter 4 zur Filtration von Tumorzellen aus dem Urin haben eine Porengröße von etwa 8 µm. Die Porengröße ist jedoch in üblicher Weise den zu untersuchenden Zellen anpassen.

-12-
Leerseite

2928790

Fig.1

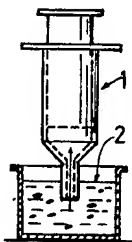
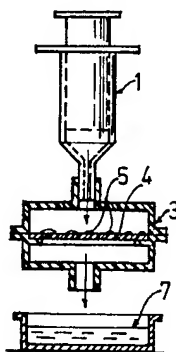


Fig.2



Nummer: 29 28 790
Int. Cl. 2 G 01 N 33/48
Anmeldetag: 17. Juli 1979
Offenlegungstag: 12. Februar 1981

Fig.3

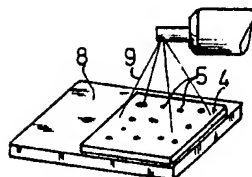


Fig.4

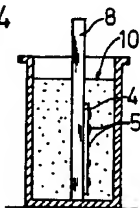


Fig.5

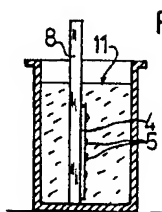
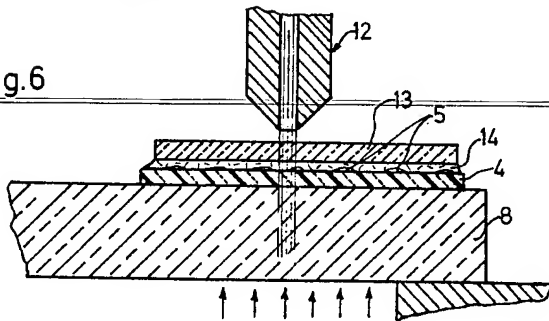


Fig.6



SM7904

030067/0109

ORIGINAL INSPECTED